

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07807

研究課題名(和文)食肉の美味しさの客観的指標とは？ - 筋線維タイプと代謝物・発現遺伝子との相関 -

研究課題名(英文)What are the objective indicators of meat palatability: correlation between muscle fiber type and metabolites/gene expression

研究代表者

澤野 祥子 (Sawano, Shoko)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：60403979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食肉として利用される家畜の筋肉は、収縮特性や代謝特性の違いから遅筋タイプ(1型)、速筋タイプ(2B型)、その中間の2A、2X型に分類される。食肉の肉質の違いは筋線維タイプ組成が鍵であると予想し、様々な形質発現の基盤となる遺伝子発現プロファイルについて、細胞1個の単位、すなわち筋線維(筋細胞)単位で遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを試みた。マウス筋切片から1細胞RNA-Seqを行い、筋線維タイプ別の網羅的遺伝子発現解析に成功し、特に2A、2X型の間に高い相関がある事を見出した。さらに豚肉のメタボローム解析から呈味性化合物も筋線維タイプにより大きく影響を受ける事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋肉には大きくマラソンランナータイプ(遅筋)とスプリンタータイプ(速筋)が存在し、このタイプの違いは我々が口にする食肉の特性にも深く関わると考えられる。本研究の成果により遅筋・速筋の違いにより、味に關与する物質の含有量が異なる事が示された。またこれまでの食肉や筋肉の研究は、筋線維(筋肉の細胞)の集合体である筋組織を用いて検討がなされてきたが、本研究では、筋組織の構成単位である1つ1つの細胞レベルで遺伝子発現プロファイルが異なる事をレーザーマイクロダイセクションと1細胞RNA-Seqという最新の技術を組み合わせる事で達成した。本解析から細胞の遺伝子発現レベルで各タイプ間の類似性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle fibers are classified into four types; slow-twitch fibers (type 1), intermediate and fast-twitch fibers (type 2A, 2X and 2B). To date, muscle fiber type composition is thought as an important factor to determine meat quality and nutritional value of meat. However, the relationships between fiber type composition and meat quality have not been fully understood. In this study, we aimed to clarify the gene expression profiling in each fiber type at a single cell level. We succeeded in the single cell RNA-Seq by applying laser microdissection method of a murine muscle cross section. We found the strong correlation between type 2A and type 2B fiber. Moreover, we performed the metabolomic analysis with pork that has different fiber type composition. We revealed that the various metabolites of pork, which may be taste components, are different depending on muscle fiber type composition.

研究分野：食品科学、栄養生理学、筋細胞生物学

キーワード：骨格筋 食肉 筋線維タイプ メタボローム解析 遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食肉として利用される家畜・家禽の筋肉は、収縮特性や代謝特性の違いから遅筋タイプ(1型) 速筋タイプ(2B型) その中間の2A, 2X型に分類される(図1)。「ロース」「ヒレ」「かた」など、食肉の肉質や呈味性が部位により異なることや、遅筋タイプが優勢な食肉は速筋タイプ優勢な食肉に比べ、軟らかく、ジューシーであり、タウリン・カルニチン・鉄分を多く含むことが報告されていることを考慮すると、食肉の特性を決定する上で、筋線維タイプ組成は非常に重要な因子となることが考えられる。我々はこれまでに4種類の筋線維タイプを迅速かつ簡便に分類する免疫染色法の開発に成功し、非常に効率的に筋線維タイプの分布を可視化することに成功した。さらに、筋線維タイプ組成が大きく異なるマウス筋組織(長趾伸筋とヒラメ筋)を検体にしてメタボローム解析を行ったところ、多数の呈味性に関わる化合物で差が見られた。すなわち同じ骨格筋でも呈味性が全く異なる事を示唆するデータを得た(2014-2015年度に実施した若手研究(B)の研究成果より)。



図1 骨格筋の特性

2. 研究の目的

(1) 食肉の肉質や味質を決定する上で、上記のように筋線維タイプ組成は非常に重要な因子である。しかしながら、この筋線維タイプ組成は、“組成”という名称が示す通り筋組織全体を反映したものであり、筋組織の構成単位である1つ1つの筋線維(筋細胞)がタイプごとにどの程度、どのような特性が異なっているのかは明らかでない。本研究の目的の一つはマウスの筋切片から、レーザーダイセクションによって単一細胞サンプルを採取し、筋線維1本単位の固有の性質(網羅的な遺伝子発現プロファイリング)を明らかにすることである。本研究では、食肉の味質解析にこれまでなかった1細胞単位での解析に着目した点が画期的である。

(2) 筋線維タイプ組成は遺伝的に決まる部分も大きいですが、環境要因によって後天的にも変化する。環境要因の中でも運動刺激は遅筋タイプを増加させる事が良く知られている。そこで本研究では、ブタに放牧運動を課し骨格筋の遅筋タイプの組成が増加するか調べるとともに、豚肉の呈味性化合物および肉質にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋線維1本単位の1細胞 RNA-Seq: 筋線維タイプ別の解析

マウスから腓腹筋を摘出後急速に凍結し、クリオスタットで横断切片を作製した。この切片に対し、それぞれ異なる蛍光色素を標識した抗ミオシン重鎖(MyHC)アイソフォーム(抗MyHC1, 2A, 2X, 2B)抗体を用いて、4重蛍光免疫染色を行った。この筋横断切片の連続切片を用意し、同定された筋線維タイプを指標に intact な切片からレーザーマイクロダイセクションにより筋片を回収し RNA を抽出した。この RNA を用いて RNA-Seq により発現遺伝子の解析を行った(図2)。

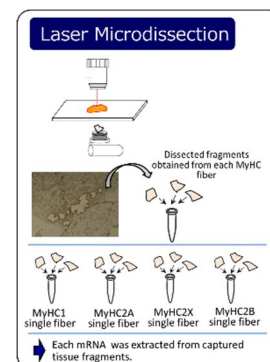


図2 レーザーマイクロダイセクションによる各タイプ筋片の回収

(2) 放牧による運動量増加が筋線維タイプ組成と肉質に及ぼす影響

実験動物として大ヨークシャー種の豚を用い、安静区(去勢オス・メス各1頭) 運動区(去勢オス・メス各1頭)に群分けを行った。安静区は豚舎内にて飼育し、運動区は32日間9:30-15:30まで6時間毎日放牧を行った。その後、胸最長筋(ロース)及び大腿二頭筋(もも肉)をサンプルとして、筋線維タイプ組成・理化学的特性を解析した。食味性の変化を調べるため、20代から40代の男女10名を対象に官能試験を行った。この豚肉に含まれる呈味性化合物の変化を検討するため、未加熱および加熱した豚肉をメタボローム解析に供した。

4. 研究成果

(1) 筋線維1本単位の1細胞 RNA-Seq: 筋線維タイプ別の解析

マウス骨格筋の横断切片を抗MyHC抗体で免疫染色し、連続切片の筋線維の配置を比較することで容易かつ正確に筋線維タイプを同定することが可能となった。MyHC1, 2A, 2X, 2Bそれぞれの筋線維片をレーザーマイクロダイセクションで切り取り、骨格筋片からRNAを抽出することに成功した。この微量RNAを用いてRNA-Seqを行い、得られたデータセットのデータ分析を行った。MyHC1, 2A, 2X, 2Bそれぞれのアイソフォームの類似性あるいは異質性について検討するため、各々の相関係数を解析した結果、MyHC1は他の3つの筋線維とは最も相関が低いことが明らかとなった。一方で、MyHC2AはMyHC2Xと非常に高い相関を示した。相関係数値及びHeat Map分布から、4つの筋線維タイプの中で、MyHC1とMyHC2Bは遺伝子レベルで最も性質が異なっていること、MyHC2AがちょうどMyHC1とMyHC2Bの中間的な性質を有すること、MyHC2XはMyHC2AとMyHC2Bの間の性質を示すが、MyHC2Aとより類似

した遺伝子発現パターンを有することが明らかになった(図3)。本成果により、各筋線維アイソフォームの相関関係、特に中間タイプ MyHC2A, 2X の知見が得られた。

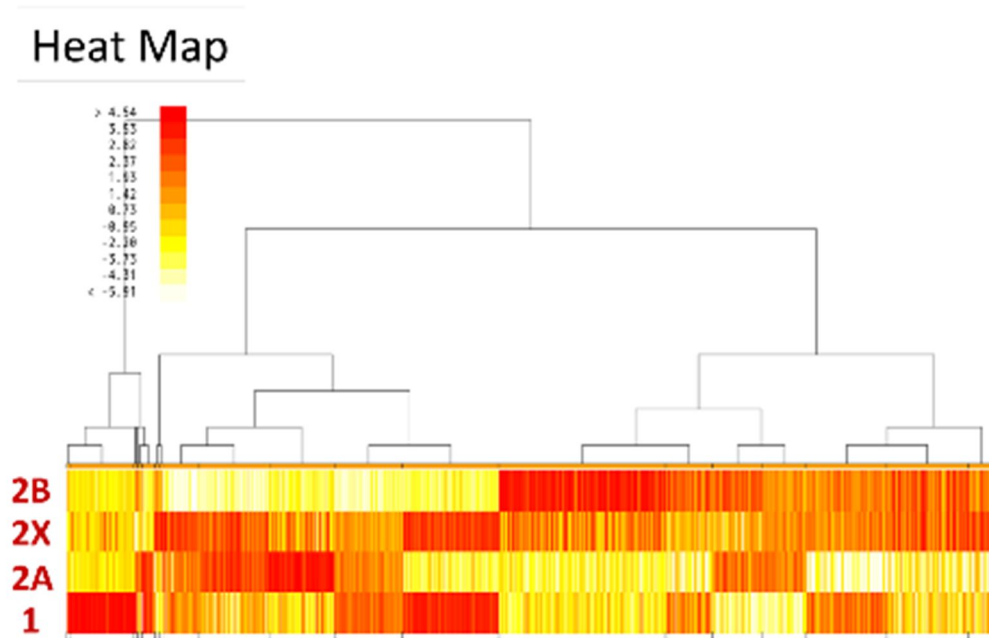


図3 筋線維タイプ別の発現遺伝子プロファイル(1細胞 RNA-Seq)

(2) 放牧による運動量増加が筋線維タイプ組成と肉質に及ぼす影響

筋線維タイプ組成及び理化学的特性

安静区および運動区のブタ骨格筋の MyHC アイソフォーム組成を SDS-PAGE で解析したところ、運動区の胸最長筋において MyHC1 組成が有意に増加し、一方で MyHC2 組成が有意に減少した。したがって、放牧により運動トレーニングと同様の効果が、豚の胸最長筋(ロース)で誘導されることが明らかになった。肉の硬さの指標である剪断力価を測定したところ、放牧区の加熱ロース肉で有意に増加した。遅筋タイプの増加が硬さの増加を引き起こすことを示した先行研究はないため、おそらく放牧による運動量の増加がコラーゲンの産生を促し、筋線維タイプとは無関係に硬さが増加したと推測された。さらに、多汁性に寄与する保水性の変化を測定した結果、放牧区の胸最長筋において保水性の上昇傾向が認められた。官能試験の結果、運動区のロース肉において「肉の味の強さ」、「口の中での香り」の評価が有意に向上した。すなわち、遅筋タイプは速筋タイプと比較して「肉の味の強さ」や「口の中での香り」に関わる呈味性化合物が多く含まれることが示唆された。

メタボローム解析

食肉の呈味性化合物は、多くは筋線維の代謝物に由来すると考えられる。そこで実際に運動刺激を与え遅筋タイプが増加した筋組織は、安静区と比較して代謝物のプロファイルが異なるのかをメタボローム解析で調べた。安静区去勢オス、安静区メス、運動区去勢オス、運動区メス、安静区加熱、運動区加熱の6検体を解析に供した。主成分解析(PCA)の結果から、去勢オスの安静区と運動区で顕著な違いが認められた。また、加熱をすると非加熱の豚肉に比べて代謝物分布が変化することも明らかになった。データが検出できた各代謝物については、性別によって運動の影響は異なり、去勢オスは運動によりアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンなどのアミノ酸量が減少し、一方で、メスは運動によりそれらの代謝物量が上がるということが分かった(図4)。核酸については IMP、GMP については去勢オスに比べメスに多く存在していることが確認された。また AMP や ATP は加熱により存在量が多くなる傾向が見られた。これらの結果を総合すると、呈味性に関わる代謝物の挙動は性差や加熱により複雑に影響を受けるが、オスでは運動により呈味性代謝物が下がる傾向にあること、逆にメスでは上がる傾向にあることが示唆された。去勢オスとメスの豚肉をプロのシェフに調理してもらいその食味性について意見を聞いたところ、「メスのほうが柔らかく美味しい」との回答を得た。すなわちブタの性別も、食味性に影響を及ぼすことが強く示唆された。

以上の結果より、運動が肉に含まれる代謝物分布に影響を及ぼすこと、加熱により呈味性核酸量が増加することが明らかになった。また、性差による肉質の違いも明確に認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mashima Daisuke, Oka Yoshiaki, Gotoh Takafumi, Tomonaga Shozo, Sawano Shoko, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Mizunoya Wataru	4. 巻 90
2. 論文標題 Correlation between skeletal muscle fiber type and free amino acid levels in Japanese Black steers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 604 ~ 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/asj.13185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 R Tatsumi, T Suzuki, Mai-Khoi Q. Do, Y Ohya, JE. Anderson, A Shibata, M Kawaguchi, S Ohya, H Ohtsubo, W Mizunoya, S Sawano, Y Komiya, R Ichitsubo, K Ojima, S Nishimatsu, T Nohno, Y Ohsawa, Y Sunada, M Nakamura, M Furuse, Y Ikeuchi, T Nishimura, T Yagi, and R E. Allen	4. 巻 35
2. 論文標題 Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cell	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 1815-1834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yusuke Komiya, Shoko Sawano, Daisuke Mashima, Rie Ichitsubo, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Wataru Mizunoya.	4. 巻 38
2. 論文標題 Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Muscle Res Cell Motil	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-017-9468-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sawano Shoko, Oza Keishi, Murakami Tetsuya, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Mizunoya Wataru	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Gender, Rearing, and Cooking on the Metabolomic Profile of Porcine Muscles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 10 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo10010010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawano Shoko, Baba Kento, Sonoda Yuka, Wakamatsu Jun-ichiro, Tomonaga Shozo, Furuse Mitsuhiro, Sato Yusuke, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide, Mizunoya Wataru	4. 巻 -
2. 論文標題 Beef extract supplementation promotes myoblast proliferation and myotube growth in C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00394-020-02205-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 間島大介・岩井芳夫・後藤貴文・澤野祥子・辰巳隆一・中村真子・水野谷航
2. 発表標題 牛肉の風味に影響を与える脂肪以外の因子の解明 筋線維タイプに着目した解析
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松吉祐児・赤星真理子・大宅駿平・水野谷航・澤野祥子・中村真子・辰巳隆一
2. 発表標題 Sema3A依存的な遅筋型筋線維形成機構の食品機能学的制御：リンゴポリフェノールによる促進と活性成分の同定
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大宅駿平・松吉祐児・川口舞・水野谷航・澤野祥子・中村真子・辰巳隆一
2. 発表標題 筋幹細胞分泌因子Sema3A による遅筋型筋線維形成誘導：ヒラメ筋の損傷・再生実験による実証
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsumi R., Suzuki T., Kawaguchi M., Do M.-K. Q., Ohya S., Matsuyoshi Y., Ohya Y., Anderson J. A., Mizunoya W., Sawano S., Sakata K., Nakamura M., Allen R. E.
2. 発表標題 Slow-fiber commitment by Sema3A secretion from myogenic stem satellite cells.
3. 学会等名 2018 FASEB Science Research Conference on “Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤野 祥子、大座 啓史、辰巳 隆一、中村 真子、水野谷 航
2. 発表標題 運動による筋線維タイプの変化によって豚肉の肉質がどう変わるか？
3. 学会等名 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澤野 祥子、水野谷 航
2. 発表標題 4種類の筋線維タイプの発現遺伝子プロファイリング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	水野谷 航 (Mizunoya Wataru) (20404056)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	